

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

Jc784 U.S. PTO  
09/624395  
07/24/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 7 月 2 6 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 2 1 1 3 0 8 号

出 願 人

Applicant (s):

富士写真フイルム株式会社

2 0 0 0 年 3 月 2 4 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 1 9 8 4 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 P24680J

【提出日】 平成11年 7月26日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 G01N 23/221

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡開成町宮台 798 番地 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 ▲ねり▼石 恵子

【特許出願人】

    【識別番号】 000005201

    【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 210 番地

    【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

    【代表者】 宗雪 雅幸

【代理人】

    【識別番号】 100073184

    【住所又は居所】 横浜市港北区新横浜 3-18-20 BENEX S-1 7 階

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 柳田 征史

    【電話番号】 045-475-2623

【選任した代理人】

    【識別番号】 100090468

    【住所又は居所】 横浜市港北区新横浜 3-18-20 BENEX S-1 7 階

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 佐久間 剛

    【電話番号】 045-475-2623

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008969

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814441

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロアレイおよびそれを用いた分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蓄積性蛍光体シート上に多種類の生体分子を配置固定してなることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項 2】 前記多種類の生体分子が、蓄積性蛍光体シートの保護層の上もしくは中に固定されていることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 3】 前記多種類の生体分子が、蓄積性蛍光体シートの蛍光体層の上もしくは中に固定されていることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロアレイ。

【請求項 4】 蓄積性蛍光体シート上に多種類の生体分子を配置固定してなるマイクロアレイに、エネルギー発生体で標識付けられた生体分子を接触させてハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされた生体分子に標識付けられたエネルギー発生体からのエネルギーを前記蓄積性蛍光体シートに蓄積させ、その後該蓄積性蛍光体シートに励起光を照射して該蓄積性蛍光体シートから蓄積エネルギーを輝尽発光光として発光させ、該輝尽発光光を光電的に検出することによりハイブリダイズされた生体分子を検出することを特徴とする生体分子分析方法。

【請求項 5】 蓄積性蛍光体シート上に多種類の検出体を配置固定してなることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項 6】 蓄積性蛍光体シート上に多種類の検出体を配置固定してなるマイクロアレイに、エネルギー発生体で標識付けられた多数の成分を含む検体を接触させ、該検体の成分のうち前記検出体と結合可能なものを該検出体と結合させ、結合された前記検体に標識付けられたエネルギー発生体からのエネルギーを前記蓄積性蛍光体シートに蓄積させ、その後該蓄積性蛍光体シートに励起光を照射し、該励起光の照射により前記蓄積性蛍光体シートから蓄積エネルギーを輝尽発光光として発光させ、該輝尽発光光を光電的に検出することにより結合した検出体の種類を検出することを特徴とする検体分析方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明はマイクロアレイおよびマイクロアレイを用いた分析方法、詳しくは、多種類の生体分子を基板上に配置固定しておき、これを標識付けられた生体分子を含む溶液とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズした生体分子を特定するマイクロアレイおよびマイクロアレイを用いた分析方法に関するものである。

【0002】

なお、ここで「マイクロアレイ」とは、後に詳述するようにマクロアレイやDNAチップを含むのみならず、さらに広い意味で使用する。

【0003】

【従来の技術】

実験医学シリーズ（株式会社羊土社出版）の第17巻（1999年）の1月号の1～5頁に、「マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析」と題する論文が掲載されており、そこにマイクロアレイを用いて遺伝子の発現解析を行う方法が詳細に説明されている。

【0004】

このマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析技術は最近広く知られ実施されており、図6に示すように、メンブレン、ガラス、スライドガラス、シリコン基板等の基板40の表面に、多種類の生体分子（cDNA、オリゴDNA、その他のDNA、PNAあるいはEST等が現在多用されている）をマトリクス状に配置固定したものをを用いる。この、基板40の表面に多種類の生体分子をマトリクス状に配置固定したものは、基板40の種類等によって、マクロアレイ、マイクロアレイ、DNAチップ等と称される。本明細書では、これらを総称して「マイクロアレイ」ということとする。

【0005】

その一方において、放射同位体あるいは蛍光体などで標識付けられたcDNA、ゲノムDNA、mRNA、totalRNAその他のRNA、dNTPあるいはPNA等の生体分子が用意される。

【0006】

そしてマトリクス状に固定された生体分子と放射性同位体などで標識付けられ

た生体分子とがハイブリダイゼーションされる。

【0007】

ここで相互にハイブリダイゼーション（結合）する生体分子が含まれていれば、両生体分子が基板上でハイブリダイズし、ハイブリダイズした生体分子の基板上の存在位置に、放射性同位体や蛍光体などが基板に固定される。一方、ハイブリダイズしなかった生体分子が配置されていた基板上的位置には放射性同位体や蛍光体などが固定されない。図6中の2重丸は、ハイブリダイズした生体分子の基板上の存在位置で、放射性同位体や蛍光体などが固定された位置を模式的に示している。なお、図6は模式的説明であってマトリクス状に配置されたドットの一つ一つが識別可能に示されているが、実際には微細ドットが高密度で配置されているため、肉眼では殆ど識別できない。

【0008】

放射性同位体で標識付けられている場合、基板40上のどこに放射性同位体が存在しているかを検出するために、放射線エネルギーを蓄積記録する蓄積性蛍光体シートを用いる方法が知られている。

【0009】

ここで用いられる蓄積性蛍光体シートは、放射性同位体から放射される放射線に曝されるとその放射線のエネルギーを蓄積し、その後にレーザ等の励起光を照射すると、蓄積されたエネルギーが輝尽発光光として発光し、放射線のエネルギーに曝されない部位は発光しないもので、代表的には、支持体上にBaFX（ここでXはハロゲン）蛍光体粒子がバインダ中に高密度に充填されたものが塗布されたものが知られており、輝尽性蛍光体を用いた放射線像変換パネルとしても知られているものである。

【0010】

この蓄積性蛍光体シート（イメージングプレートとも言い、図中、IPで示す）が、図7に示すように、ハイブリダイゼーションの結果局所的に放射性同位体が固定されている基板40の表面に密着され、局所的に放射線に曝される。なお図7では、基板40が図6の姿勢から上下反転されて蓄積性蛍光体シートIPに密着されている。

## 【0 0 1 1】

この結果、蓄積性蛍光体シートは局所的に放射線に曝され、その後励起光に曝されたときに局所的に発光し、その発光位置から、ハイブリダイズした生体分子の基板上の存在位置が特定され、その存在位置からハイブリダイズした生体分子の種類が特定される。図 8 はこの読取工程を模式的に示すもので、図中の丸印が、局所的に放射線に曝されて放射線エネルギーを蓄積した場所を示しており、4 1 は励起光を示し、4 2 はそれによって発光した輝光を示している。

## 【0 0 1 2】

この蓄積性蛍光体シート IP は、励起光に曝されて発光することで、放射線を蓄積した部分が蓄積前の状態に復帰することから、繰返し使用できるという性質を有しているものの、前記した従来の方法では、図 7 に示すように、蓄積性蛍光体シート IP を基板 4 0 に対して正確に位置決めし、全体的に密着して重ね合わせる処理が必要とされ、この処理に時間を取られるという問題を有する。また、蓄積性蛍光体シート IP を基板 4 0 に密着させて放射線エネルギーを蓄積性蛍光体シート IP に蓄積する工程を経るため、微弱な放射線を高感度で検出することができないという難点がある。

## 【0 0 1 3】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、マイクロアレイに対して蓄積性蛍光体シートを位置決めして重ね合わせる操作を不要とし、処理の時間を短縮するとともに、検出の感度を向上させることを可能にするマイクロアレイおよびそれを用いた分析方法を提供することを目的とするものである。

## 【0 0 1 4】

なお、本発明では、マイクロアレイの用途を DNA チップのように遺伝子発現解析、塩基配列の決定、変異解析、多型解析など、遺伝子の解析に供するものに限定せず、さらに広く、何らかの反応により、基板にスポット状に固定配置された多種の検出体に選択的に結合する検体の分析にも応用できるものとして、広く定義するものとする。

## 【0 0 1 5】

【課題を解決するための手段】

本発明によるマイクロアレイは、蓄積性蛍光体シート上に多種類の生体分子を配置固定してなることを特徴とするものである。

【0016】

前記多種類の生体分子は、蓄積性蛍光体シートの保護層の上もしくは保護層の中に固定されていてもよいし、蓄積性蛍光体シートの蛍光体層の上もしくは蛍光体層の中に固定されていてもよい。いずれの場合も、勿論、標識付けられた生体分子が固定された生体分子に接触できるように、固定された生体分子は蓄積性蛍光体シートの表面に露出しているか、少なくとも標識付けられた生体分子とハイブリダイゼーション等の反応をして、結合できる形態で固定されていなければならない。

【0017】

用途によっては、本発明によるマイクロアレイにおいて蓄積性蛍光体シート上にスポット状に配置固定されるものは生体分子に限らず、何らかの反応により、その性質の種類によって検体と選択的に結合するものであれば、多種多様のものであり得るものであり、これらを総称して、「検出体」という。

【0018】

したがって、本発明の他の態様によれば、本発明によるマイクロアレイは、蓄積性蛍光体シート上に多種類の検出体を配置固定してなることを特徴とするものである。

【0019】

本発明による生体分子分析方法は、蓄積性蛍光体シート上に多種類の生体分子を配置固定してなるマイクロアレイに、エネルギー発生体で標識付けられた生体分子を接触させてハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされた生体分子に標識付けられたエネルギー発生体からのエネルギーを蓄積性蛍光体シートに蓄積させ、その後、蓄積性蛍光体シートに励起光を照射し、励起光の照射により蓄積性蛍光体シートから蓄積エネルギーを輝尽発光光として発光させ、輝尽発光光を光電的に検出することによりハイブリダイズされた生体分子を検出することを特徴とするものである。



【0020】

また、本発明の他の態様によれば、本発明の検体分析方法は、蓄積性蛍光体シート上に多種類の検出体を配置固定してなるマイクロアレイに、エネルギー発生体で標識付けられた多数の成分を含む検体を接触させ、検体の成分のうち前記検出体と結合可能なものを検出体と結合させ、結合された検体に標識付けられたエネルギー発生体からのエネルギーを蓄積性蛍光体シートに蓄積させ、その後、蓄積性蛍光体シートに励起光を照射し、励起光の照射により蓄積性蛍光体シートから蓄積エネルギーを輝尽発光光として発光させ、輝尽発光光を光電的に検出することにより結合した検出体の種類を検出することを特徴とするものである。

【0021】

蓄積性蛍光体シートに分散配置される生体分子は、cDNA、オリゴDNA、その他のDNA、PNAあるいはEST等のアレイ方法で用いられる生体分子であればよく、その種類を問わない。

【0022】

マトリクス状に配置するとは、縦方向、横方向に多数配置されていることをいい、必ずしも、正方格子状に限られず、一つ一つの格子がひし形であってもよい。また、単位となるものが四辺形に限られず、例えば六角形であってもよい。要は、狭い面積中に多数のドットが高密度に配置されて言うことをいう。また、配置されるべき格子点のいくつに生体分子が配置されないで空所になっていてもここでいうマトリクス状に相当する。

【0023】

第1のエネルギー発生体で標識付けられる生体分子は、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、totalRNA、その他のRNA、dNTPあるいはPNA等の生体分子が通常用いられるが、これらは例示であってこれらに限られない。

【0024】

ハイブリダイゼーションとは、相補的塩基配列が2本鎖を形成する学問的定義によるものの他、例えば特異的結合によって結合するもの等の一般をいい、その後洗浄しても除去されないように結合することを言う。

【0025】

さらに何らかの反応により結合するとは、例えば各種のアフィニティー（親和性）が考えられる。

【0026】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、従来技術では必要とされていた基板と蓄積性蛍光体シートを重ね合わせる操作が必要でなくなり、当然に精密に位置合わせする必要もなく、処理の自動化が著しく容易化され、処理時間が短縮される。また、人が処理する場合にも、処理工程が省略され、処理時間が短縮化される。

【0027】

さらに、蓄積性蛍光体シートを基板に密着させて放射線エネルギーを蓄積性蛍光体シートに蓄積させる工程を経ず、標識付けられたエネルギー発生体が、蓄積性蛍光体の直近に存在するため、微弱な放射線を高感度で検出することできるという効果がある。したがって、ドットの更なる微小化や、ハイブリダイゼーションに要する時間の短縮化が可能となる。

【0028】

【発明の実施の形態】

図1において、2は蓄積性蛍光体シート（イメージングプレート）を示し、ポリエステル支持体上に、バインダ中にBaFX（ここでXはハロゲン）蛍光体粒子を高密度に充填した層が形成されている。本明細書ではこの層を蛍光体層という。この蛍光体層の表面は保護層で覆われている。

【0029】

この蓄積性蛍光体シート2の保護層上に、多種類の生体分子をマトリクス状に配置して固定する。この工程は従来から知られている方法で実行される。すなわち、蓄積性蛍光体シートの保護層の表面をポリ-エル-リシン溶液に浸した後で乾燥させてコート層を形成するなどの下処理を行った後、cDNA等の生体分子を溶かした溶液を市販のスポット装置を用いて蓄積性蛍光体シートの表面にドット状に配置固定する（図2）。このようにして、マトリクス状のcDNAのドット4が蓄積性蛍光体シート2上に配置される。

【0030】

次に、解析する細胞から抽出したRNAを用いて調整したpoly(A)RNAをRI（放射性同位体）で標識付け、標識RNA 6とし、これを溶かした溶液を調整する。ここでは<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>14</sup>C等の放射性同位体が利用される。

【0031】

次に調整された溶液の中に蓄積性蛍光体シート2を浸して生体分子をハイブリダイゼーションさせる。（図3）。その後、蓄積性蛍光体シート2の表面を洗浄することにより、蓄積性蛍光体シート2に固定されていた生体分子とハイブリダイゼーションされなかった生体分子（RIで標識付けられている生体分子）6を取り除き、図4に模式的に示すように、ハイブリダイゼーションされたRIで標識付けられた生体分子8のみを蓄積性蛍光体シート2上を残す。

【0032】

その後、蓄積性蛍光体シート2の全面に可視光を照射し、情報を消去した後、暗所に蓄積性蛍光体シート2を放置し、ハイブリダイゼーションされた、放射性同位体で標識付けられた生体分子からの放射線エネルギーを蓄積性蛍光体に蓄積させる。

【0033】

次に蓄積性蛍光体シート2の表面の全域をレーザ10で照射し、ハイブリダイゼーションの過程で蓄積性蛍光体シート2上のcDNAのドット4にハイブリダイズされた標識付きの生体分子8の標識である放射性同位体からの放射線に曝されて放射線エネルギーを蓄積した箇所において蓄積性蛍光体シート2から輝尽発光光を発光させ、それをフォトマルチプライヤ（PMT）により光電的に検出して電気信号に変換し、これをコンピュータCに入力することにより、発光位置を示す情報をコンピュータCに記憶させる。

【0034】

図5に示すように、例えばハーフミラーまたはダイクロイックミラー12を用いて、読取用レーザ10を反射して蓄積性蛍光体シート2の表面を照射し、蓄積性蛍光体シート2で発光した輝尽発光光14をミラー12を通過させてPMTに向かわせて検出する。

【0035】

この位置情報は、蓄積性蛍光体シート2のどの位置にどのcDNAを配置したか予め記憶されている情報と比較され、細胞から抽出したRNAとハイブリダイゼーションしたcDNAとハイブリダイゼーションしなかったcDNAが特定される。

【0036】

上記実施の形態では、蓄積性蛍光体シート2の蛍光体層の表面に保護層が形成され、その保護層の表面上に生体分子を固定する場合について説明したが、これに代えて、浸透性の保護層を用い、生体分子を保護膜内に固定してもよい。

【0037】

あるいは、保護層を有しない蓄積性蛍光体シートを用い、蛍光体層表面に生体分子を固定してもよい。あるいは、保護層のない蛍光体層を空隙の多い浸透性の層とし、蛍光体層内に生体分子を固定してもよい。この場合は、蛍光体が損傷されないように、表面がコーティングされた蛍光体粒子を用いて蛍光体層を形成することが好ましい。

【0038】

なお、上記実施の形態では、蓄積性蛍光体としてポリエスタスターベースに、バインダ中にBaFX（ここでXはハロゲン）蛍光体粒子を高密度に充填したものを使用しているが、この代わりに従来知られている各種の蓄積性蛍光体を使用できることは言うまでもない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施の形態で用いる蓄積性蛍光体シートの一例を示す斜視図

【図2】

蓄積性蛍光体シートの表面にマトリクス状に生体分子が配置固定された状態を模式的に示す斜視図

【図3】

ハイブリダイゼーション工程を模式的に示す斜視図

【図4】

ハイブリダイゼーション後の状態を模式的に示す斜視図

【図 5】

読取用レーザを照射して発光させる様子を模式的に示す斜視図

【図 6】

従来のマイクロアレイの基板を模式的に示す斜視図

【図 7】

従来のマイクロアレイ基板に蓄積性蛍光体シートを重ね合わせて蓄積性蛍光体シートを放射線に曝す工程を模式的に示す斜視図

【図 8】

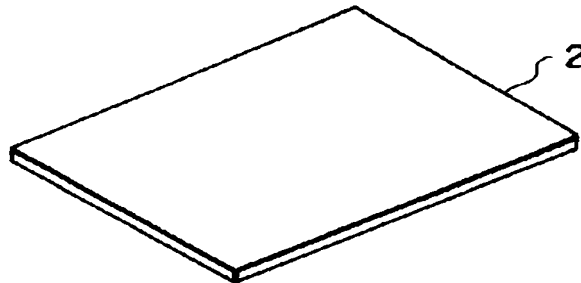
蓄積性蛍光体シートに蓄積された像の読取過程を模式的に示す斜視図

【符号の説明】

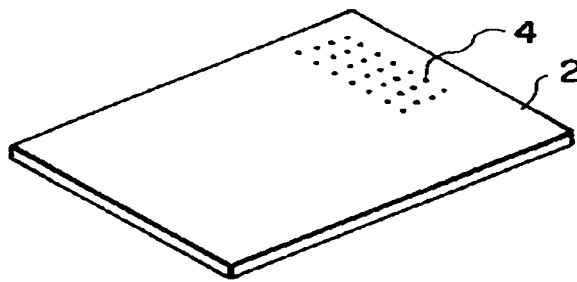
- 2     蓄積性蛍光体シート
- 4     cDNA のマトリクス
- 6     標識付けられた RNA
- 10    読取用レーザ
- PMT   フォトマルチプライヤ

【書類名】 図面

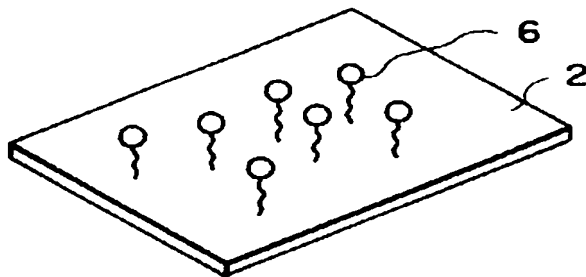
【図 1】



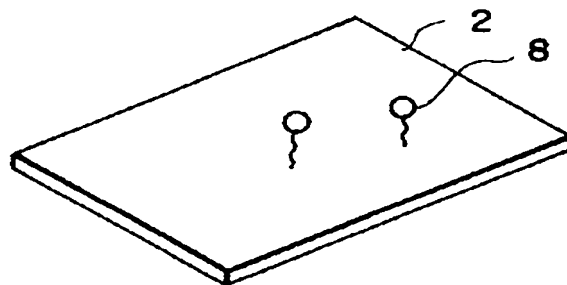
【図 2】



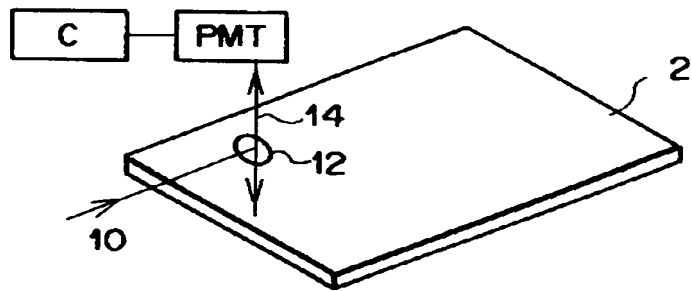
【図 3】



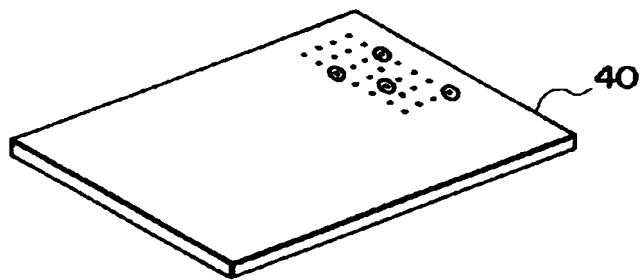
【図 4】



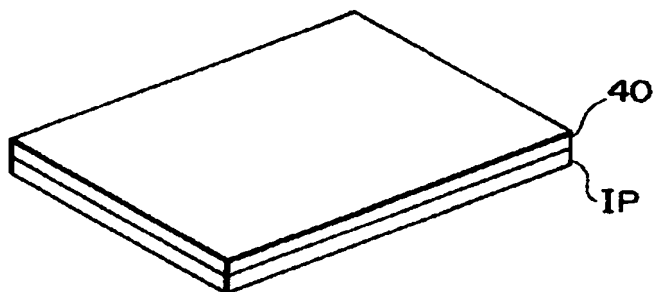
【図 5】



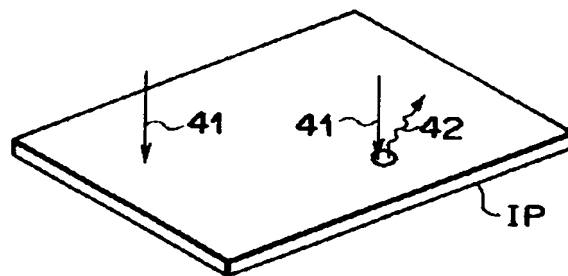
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マイクロアレイを用いる遺伝子発現解析において、処理時間の短縮化と感度向上を実現する。

【解決手段】 蓄積性蛍光体シート 2 上に多種類の生体分子 4 を配置固定してマイクロアレイを作成する。このマイクロアレイに、エネルギー発生体で標識付けられた生体分子を接触させてハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされた生体分子に標識付けられたエネルギー発生体からのエネルギーを蓄積性蛍光体シートに蓄積させ、その後、蓄積性蛍光体シートに励起光を照射し、励起光の照射により蓄積性蛍光体シートから蓄積エネルギーを輝尽発光光として発光させ、輝尽発光光を光電的に検出することによりハイブリダイズされた生体分子を検出する。

【選択図】 図 2



職権訂正履歴（書類修正）

特許出願の番号	平成11年 特許願 第211308号
受付番号	59900716394
書類名	特許願
担当官	大畑 智昭 7392
作成日	平成11年10月18日

<修正内容>

明細書中の図面を図面ドキュメント部に記録する。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第211308号
受付番号	59900716394
書類名	特許願
担当官	大畑 智昭 7392
作成日	平成11年10月25日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼210番地

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100073184

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-20 B

ENEX S-1 7階 柳田国際特許事務所

【氏名又は名称】 柳田 征史

【選任した代理人】

【識別番号】 100090468

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-20 B

ENEX S-1 7階 柳田国際特許事務所

【氏名又は名称】 佐久間 剛

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地  
氏 名 富士写真フイルム株式会社